

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|---|--------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------|------------|--------------------------|----|--|--------|--|--|--|--|----------|--|--|--|--|--------|--|--|--|--|----------|--|--|--|--|--------|--|--|--|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027</p> | A1 | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07855</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05127</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1998 (11.08.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">197 34 764.9</td> <td style="width: 33%;">11. August 1997 (11.08.97)</td> <td style="width: 33%;">DE</td> </tr> <tr> <td>197 58 501.9</td> <td>15. Oktober 1997 (15.10.97)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>60/078,386</td> <td>18. März 1998 (18.03.98)</td> <td>US</td> </tr> </table> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEM-OREC STOFFEL GMBH [DE/DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STOFFEL, Wilhelm [DE/DE]; Kornelimünsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE). HOFMANN, Kay [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE). TOMIUK, Stephan [DE/DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p> | | | 197 34 764.9 | 11. August 1997 (11.08.97) | DE | 197 58 501.9 | 15. Oktober 1997 (15.10.97) | DE | 60/078,386 | 18. März 1998 (18.03.98) | US | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 197 34 764.9 | 11. August 1997 (11.08.97) | DE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 197 58 501.9 | 15. Oktober 1997 (15.10.97) | DE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60/078,386 | 18. März 1998 (18.03.98) | US | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>(54) Title: NEUTRAL SPHINGOMYELINASE</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUTRALE SPHINGOMYELINASE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to eukaryotic neutral sphingomyelinase (nSMase) and the use thereof.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und seine Anwendung.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table style="margin: auto; border: none;"> <tr> <td style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">HEK mock-transf.</td> <td style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">HEK nSMase weak</td> <td style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">HEK nSMase high</td> <td style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">U937 mock-transf.</td> <td style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">U937 nSMase</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; padding-right: 10px;">A</td> <td colspan="4"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; padding-right: 10px;">396 bp</td> <td colspan="4"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; padding-right: 10px;">B</td> <td colspan="4"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; padding-right: 10px;">298 bp</td> <td colspan="4"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; padding-right: 10px;">C</td> <td colspan="4"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; padding-right: 10px;">45 kDa</td> <td colspan="4"></td> </tr> </table> | | | HEK mock-transf. | HEK nSMase weak | HEK nSMase high | U937 mock-transf. | U937 nSMase | A | | | | | 396 bp | | | | | B | | | | | 298 bp | | | | | C | | | | | 45 kDa | | | | |
| HEK mock-transf. | HEK nSMase weak | HEK nSMase high | U937 mock-transf. | U937 nSMase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 396 bp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 298 bp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 kDa | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Neutrale Sphingomyelinase

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren, und ihre Anwendung.

Sphingomyelin ist eine wesentliche Komponente von Plasmamembranen. Der Abbau des Sphingomyelins gibt eine Vielzahl von Substanzen, die potentielle second messenger Eigenschaften haben, z.B. Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat. Es sind zwei sphingomyelinspaltende Enzymaktivitäten bekannt, zum einen die der lysosomalen sauren Sphingomyelinase und zum anderen die der plasmamembran-gebundenen neutralen Sphingomyelinase.

Die bakterielle neutrale Sphingomyelinase ist ein sezerniertes, lösliches Protein.

Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals Nukleinsäuren, codierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, verfügbar gemacht. Die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) ist dadurch charakterisiert, daß sie Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und die Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym. Die maximale Aktivität wird im neutralen pH-Bereich erzielt.

Figur 1 zeigt die Gensequenz der humanen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 2 zeigt die Gensequenz der murinen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse von Northern- und Westernblots nSMase-überexprimierender Zelllinien.

Figur 4 zeigt die Strategie zur Erzeugung von murinen Knockout-Mutanten. Die Buchstaben symbolisieren Restriktionsschnittstellen.

Figur 5 zeigt Konstrukte zur Gewinnung transgener Mausmutanten.

Bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäure um eine Nukleinsäure, die für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers codiert. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich dabei um die humane und murine neutrale Sphingomyelinase. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sind als Seq. ID. Nr. 3 und Seq. ID. Nr. 4 offenbart.

Teile der Nukleinsäuresequenzen stimmen mit der EST-Sequenzen AA028477 und AA013912 (murin) und W32352 und AA056024 (human) überein.

Bei Kenntnis der Aminosäure- und Nukleinsäurestruktur der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase kann der Fachmann unter Berücksichtigung der hohen Homologie zwischen der humanen und murinen nSMase die entsprechenden Nukleinsäuren und Proteine aus anderen Eukaryonten leicht auffinden. Dazu kann er zum einen kreuzreagierende Antikörper für eine spezifische affinitätschromatographische Aufreinigung einsetzen, oder er kann auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenz Oligonukleotidprimer synthetisieren und die gesuchten Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion in einer cDNA-Bank des Eukaryonten amplifizieren. Die entsprechende cDNA-Bank kann durch Isolierung von mRNA aus einer Gewebeprobe und anschließende Reverse-Transkription in an sich bekannter Weise erhalten werden. Aus der Nukleinsäuresequenz kann mit Hilfe des genetischen Codes die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Alternativ ist es hierzu auch möglich, homologe Sequenzen in EST (Expressed Sequence Tags)-Datenbanken zu suchen und zu kombinieren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in pro- oder eukaryontischen Systeme. Darüber hinaus sind sie auch zur Expression der nSMase in vivo im Sinne einer Gentherapie oder insbesondere in Form von Fragmenten auch in komplementärer Struktur als Antisense-Nukleotide zur Verringerung der Expression der nSMase geeignet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältliche eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.

Die erfindungsgemäße nSMase läßt sich durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen herstellen. Insbesondere sind eukaryontische Expressionssysteme geeignet. Entsprechende eukaryontische Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt wie beispielsweise pRc/CMV (Firma Stratagene). Die Aufreinigung aus gentechnisch veränderten Organismen bietet, insbesondere im Falle der Überexpression, einen leichten und direkten Zugang zur erfindungsgemäßen nSMase und erlaubt darüber hinaus die Isolierung in größeren Mengen.

Bevorzugt handelt es sich um die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere um humane oder murine neutrale Sphingomyelinase. Die Aminosäuresequenzen der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase sind als Seq. ID. Nr. 1 und 2 wiedergegeben.

Die Molekulargewichte der humanen bzw. murinen Sphingomyelinase beträgt 47,6 bzw. 47,5 kDa. Im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen enthalten die erfindungsgemäßen nSMasen von Säugetieren keine Signalsequenz am N-Terminus. Aufgrund der Hydrophobizi-

tätsanalyse kann davon ausgegangen werden, daß zwei benachbarte hydrophobe Membrandomänen am C-Terminus durch acht Aminosäuren getrennt sind. Es scheint sich daher um integrale Membranproteine zu handeln, deren katalytisch aktive Domäne zum Cytosol zeigt, während nur ein geringer Anteil der Enzyme Kontakt zur extrazellulären Umgebung hat. Dies ist im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen, bei denen es sich um sekretierte, lösliche Proteine handelt, ist aber in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen zu den Eigenschaften der neutralen Sphingomyelinasen von Säugetieren. Die 1,7 kb mRNA der murinen nSMase wird gemäß Northern Blot Analyse in allen Geweben exprimiert. In Nieren, Hirn, Leber, Herz und Lunge zeigt der Northern Blot ein starkes Signal, während die Expression in der Milz gering zu sein scheint. Diese Messung war nicht in Übereinstimmung mit den gemessenen enzymatischen Aktivitäten der entsprechenden Gewebe. Dies spricht für eine posttranskriptionale Regulation der nSMase.

Das pH-Optimum der erfindungsgemäßen neutralen Sphingomyelinase liegt im Bereich von 6,5 bis 7,5 mit einem K_m -Wert für C18 Sphingomyelin im Bereich von $1,0$ bis $1,5 \times 10^{-5}$ M. Die Aktivität ist magnesiumionenabhängig, die Zugabe von EDTA führt zu einer Inhibierung der SMase-Aktivität, kann jedoch durch Zugabe von Mn^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen wiederhergestellt werden. Die Zugabe von 0,3 bis 0,5% Triton X-100 erhöht die Enzymaktivität. Die Aktivität ist unbeeinflusst durch Behandlung mit DTT oder 2-Mercaptoethanol, wohingegen die Zugabe von 20 mM Glutathion zur Inhibierung führte. Die Aktivität der nSMase ist nicht auf Sphingomyelin limitiert, auch das strukturell verwandte Phosphatidylcholin wurde mit etwa 3% Aktivität gespalten.

Weiterhin beansprucht werden Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase. Unter den Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) und an-

schließende Expression erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen. Dabei können sowohl Aminosäuren deletiert, eingefügt oder konservativ ausgetauscht werden. Konservativer Austausch bedeutet, daß eine Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wird, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist.

So sind beispielsweise folgende Aminosäuren austauschbar: Serin für/gegen Alanin, Alanin für/gegen Glycin, Methionin für/gegen Serin, Lysin für/gegen Arginin, Lysin für/gegen Serin.

Insbesondere umfaßt der Begriff Varianten auch N- und/oder C-terminale verkürzte Proteine sowie acetylierte, glykosylierte, amidierte und/oder phosphorylierte Derivate.

Die Aktivität der nSMase scheint zumindest zum Teil im C-terminalen Bereich zu liegen, da das Fragment 1 bis 282 der murinen nSMase bei Expression in HEK293 Zellen keine Erhöhung der Sphingomyelinase-Aktivität zeigte. C-terminale Fragmente der nSMase sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Auch Verbindungen, bei denen nSMase oder seine Varianten mit weiteren Molekülen wie Farbstoffe, Radionukliden oder Affinitätskomponenten gekoppelt sind, stellen erfindungsgemäße Varianten dar.

Beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren bzw. komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder um nukleaseresistenter Analoga handeln. Nukleaseresistente Analoga sind insbesondere solche Verbindungen, in denen die Phosphodiesterbindung durch hydrolysestabile Verbindungen modifiziert sind, beispielsweise Phosphothioate, Methylphosphonate o.ä.

Für Antisensenukleotide sind insbesondere kurze Fragmente der Nukleinsäuren geeignet. Diese sollten aus Gründen der Spezifität bevorzugt mehr als 6, noch mehr bevorzugt mehr als 8 und am

meisten bevorzugt mehr als 12 Nukleotide aufweisen. Aus Gründen der Diffusion und der Kosten haben sie üblicherweise eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden, bevorzugt 24 oder weniger und noch mehr bevorzugt 18 oder weniger Nukleotide.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von Nukleinsäuren, die für diagnostische oder therapeutische Zwecke mit anderen Molekülen gekoppelt sind, beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Markern oder Affinitätskomponenten, sowie Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und der zu diesen Nukleinsäuren komplementären Nukleinsäuren sowie Varianten der Nukleinsäuren.

Fragmente bezeichnet dabei Nukleinsäuren, die am 5' oder 3' oder an beiden Seiten verkürzt sind. Unter dem Begriff "Varianten" wird verstanden, daß diese Nukleinsäuren unter stringenten Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. dazu komplementären Nukleinsäuren hybridisieren. Unter dem Begriff "stringente Bedingungen" wird verstanden, daß die Hybridisierung bei Bedingungen durchgeführt wird, bei der die Temperatur noch bis zu 10°C unter der Temperatur liegt (bei sonst identischen Bedingungen), bei der exakt komplementäre Nukleinsäuren gerade noch hybridisieren würden. Wenn beispielsweise eine exakt hybridisierende Nukleinsäure unter gegebenen Bedingungen bis zu einer Temperatur von ca. 55°C hybridisiert, dann sind stringente Bedingungen Temperaturen gleich oder höher 45°C. Bevorzugt ist der Temperaturbereich für stringente Bedingungen von 5°C, noch mehr bevorzugt von 3°C.

Desweiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen die erfindungsgemäße nSMase oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich insbesondere zum Einsatz in der Diagnostik, dem Fachmann an sich bekannten Immunoassays, zur histologischen Untersuchung sowie als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der nSMase verbunden sind. Solche erfindungsgemäßen Antikörper können mit dem Fachmann an sich bekannten Verfahren durch

Immunisierung mit nSMase, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Peptid- und Nukleinsäurenfragmenten in Gegenwart von Hilfsreagenzien erhalten werden.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Zelllinien, die die erfindungsgemäße nSMase überexprimieren. Solche Zelllinien sind erhältlich durch Transfektion mit Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für nSMase kodieren, enthalten. Im Falle von eukaryontischen Zelllinien kann die Transfektion beispielsweise durch Elektroporation erfolgen. Die Zelllinien sind dabei vorzugsweise stabiltransfiziert.

Überexpression bedeutet in diesem Zusammenhang, daß diese Zelllinie eine höhere Aktivität der nSMase aufweisen als die Zelllinien, die nicht mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfiziert wurden. Geeignete eukaryontische Zelllinien sind beispielsweise die Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat:

Die Zelllinien zeigten in Experimenten eine spezifische nSMase-Aktivität zwischen 0,3 und 10 $\mu\text{mol/mg}$ Protein/Stunde.

Figur 3 zeigt die Northern und Western Blot Analyse der nSMase-Expression in transfizierten Zelllinien. Teil A zeigt dabei das Ergebnis einer RT-PCR der Gesamtzelle RNA mit Primern, die mit humaner und muriner nSMase cDNA hybridisieren. Teil B zeigt als Kontrolle die T-PCR der Gesamt-RNA mit Primern, die zu humanem β -Actin cDNA hybridisieren. Teil C zeigt den Westernblot des Plasma Membran Proteinextrakts von verschiedenen HEK 293 Zelllinien nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit dem polyklonalen Anti-nSMase-Antikörpern.

Die Zugabe von 0,5 mM Arachidonsäure führte zu einer dreifachen Erhöhung der nSMase-Aktivität in den überexprimierenden HEK-Zellen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein transgenes Säugetier, das eine Überexpression (gain of function) oder eine Gendefi-

zienz bzw. einen Gendefekt (loss of function) für die erfindungsgemäße nSMase aufweist. Bevorzugt handelt es sich bei dem Säugetier um ein Nagetier, insbesondere eine Maus. Diese transgenen Säugetiere sind durch für den Fachmann an sich bekannte Verfahren erhältlich und eignen sich insbesondere zur Funktionsaufklärung der neutralen Sphingomyelinase. Für transgene Säugetiere werden definierte Genkonstrukte durch DNA-Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle im Einzellstadium injiziert, um die Expression des zusätzlichen Gens zu erreichen. Durch zielgerichtete Veränderung eines Gens im Genoms von ES-Zellen, die nachfolgend in Blastozysten injiziert werden, wird die Funktion eines Gens ausgeschaltet.

Die Strategie und Konstrukte zur Generierung der Mausmutanten sind in Figur 4 und 5 gezeigt.

Bevorzugt handelt es sich bei den transgenen Tieren um Tiere, bei denen das Gen zeitlich und gewebsspezifisch von außen induzierbar ein- bzw. ausgeschaltet werden kann. Entsprechende transgene Säugetiere eignen sich insbesondere zur Aufklärung der mit der erfindungsgemäßen nSMase im Zusammenhang stehenden Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen, die wiederum diagnostische oder therapeutische Anwendungen eröffnen. Insbesondere eignen sich die transgenen Säugetiere zum Screening von pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die erfindungsgemäße eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie die erfindungsgemäßen Antikörper können in Arzneimitteln und Diagnostikmitteln gegebenenfalls zusammen mit weiteren Hilfsstoffen enthalten sein. Diese Arznei- und Diagnostikmittel eignen sich zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

Insbesondere sind dies Erkrankungen, bei denen Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen und Stoffwechselstörungen eine Rolle spielen. Dies können beispielsweise Krebserkrankungen oder Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) sein.

Ein erfindungsgemäßes pharmazeutisches Screening-Verfahren beruht auf der Veränderung der Expression oder Aktivität der erfindungsgemäßen nSMase in nSMase-überexprimierenden Zelllinien bei Zugabe von mindestens einer potentiell pharmazeutisch wirksamen Substanz. Die Zelllinien eignen sich somit insbesondere zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden.

Beispiel 1

Klonierung der Nukleinsäure

Die erfindungsgemäßen für die neutrale Sphingomyelinase kodierenden Nukleinsäuren wurden in die NotI Schnittstellen der Klonierungsstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/CMV (Stratagene) kloniert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung mit einem Perkin-Elmer DNA-Sequenzer 377A erhalten.

Beispiel 2

Klonierung der RNA

Die Gesamt-RNA wurde nach bekannten Methoden aus verschiedenen Organen von acht drei Wochen alten CD1 Mäusen isoliert und Poly(A')-RNA wurde durch Affinitätsreinigung an Oligo(dT)cellulose (Boehringer Mannheim Deutschland) gemäß Standardmethoden isoliert.

Beispiel 3

Überexprimierende Zelllinien

U937 Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 1 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 0,03% Glutamin bei 37°C und 5% CO₂. 5x10⁶-Zellen wurden mit 1 µg linearisierter Plasmid-DNA, die für die erfindungsgemäße nSMase kodierte durch Elektroporation mit einem "gene pulser" (Firma Bio-Rad) transfiziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte unter 1 mg/ml Geneticin (G418, Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Die aus den Zelllinien aufgereinigte nSMase zeigte eine spezifische Aktivität zwischen 0,3 und 10 µmol/mg Protein/Stunde. Das pH-Optimum lag bei 6,5 und 7,5. Der K_m-Wert für C18 Sphingomyelin betrug 1,0 bis 1,5 x 10⁻⁵ M. Die Aktivität war von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig; die Zugabe von EDTA inhibierte die Aktivität.

Beispiel 4

Messung der nSMase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität wurde in Zellen und Mäusegewebe untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1.000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2.500 g gefolgt von einer Extraktion mit Lysepuffer mit 0,2% Triton X-100. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 100.000 g.

Gewebe von drei Wochen alten Mäusen wurde in kaltem Lysepuffer homogenisiert. Die zu untersuchende Menge an Protein oder homogenisiertem Gewebe wurde mit 10 nm (80.000 dpm) [N-¹⁴CH₃]-Sphingomyelin für 30 min bei 37° in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Dann wurden 100 µl Wasser zugesetzt und unreaktiertes Substrat durch Extraktion mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) entfernt. Die Radioaktivität der wässrigen Phase, die

das enzymatisch freigesetzte Phosphocholin enthielt, wurde in einem Sintillationszähler gemessen.

Beispiel 5

Polyklonale Antikörper

Kaninchen wurden mit dem synthetischen Peptide CDPHSDKPFSDHE (entsprechend den Aminosäuren 261 bis 273 der murinen nSMase) gekoppelt an Keyhole-Limpit-Hemocyanin immunisiert. Das polyklonale Antikörperserum wurde durch Chromatographie an Hydroxyapatit und Affinitätschromatographie an einer Säule, an der das oben genannte synthetische Peptide gebunden war, gereinigt.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sie für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere für humane oder murine neutrale Sphingomyelinase kodiert.
3. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die neutrale Sphingomyelinase Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und ihre Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist.
4. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga handelt.
6. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 ist.
8. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase erhältlich durch Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 6, insbesondere mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2.

9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder

auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apoptose beruhen.

17. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 durch chemische Peptidsynthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.
21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.
22. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.

23. Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8.
24. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.

1 / 12

human neutral Sphingomyelinase (NSM) Gene Sequence

```

1  ACCGCGGCGCTCGCTGGAGAGTTCGAGCCGCTAGCGCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA 60
   -----+-----+-----+-----+-----+
   TGGCGCCGGCAGCGACCTCTCAAGCTCGGCGGATCGCGGGACCTCCAGGGGTGGTACT

61  AGCCCAACTTCTCCCTGGGACTGCGGATCTTCAACCTCAACTGCTGGTGAGTGCGTCTGC 120
   -----+-----+-----+-----+-----+
   TCGGGTTGAAGAGGGACGCTGACGCCTAGAAGTTGGAGTTGACGACCACTCACGCAGACG

121  GGAGTGGGTCTGGGGGCCACCTTCCGTTCCGACCCATGCAGCCTTCCTCCCCCTATCCC 180
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CCTCACGCCAGACCCCGGTGGAAGCAAGCGTGGGTACGTCGGAAGGAGGGGATAGGG

181  GCCCCACGATCTCAGGGTGTAGGGAACACCCGAACCTCCAAGTCCACATCTGCCCCAG 240
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CGGGGTGTAGAGTCCCACATCCCTTTTGGGCTTGGAGGTTTCAGGTGTAGACCGGGGTC

241  CGCCGGTGGTCCCAGCAGTCGCTCCCTGCCCGCTCTTCCCTTCCTTAGGGGCATTCC 300
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GCGGCCACCAAGGTCGTGACGGAGGGACGGGCGAGAAGGAAGGAATCCCCGTAAGG

301  GTACTTGACGAAGCACCGGGCGACCGCATGAGCGCCTGGGAGACTTTCTGAACCAGGA 360
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CATGAAGTTCGTGCGCCCGCTGGCGTACTCCGCGGACCTCTGAAAGACTTGGTCCT

361  GAGCTTCGACCTGGCTTTGCTGGAGGAGGTGAGATTGTGCAGCACGGTGCGGAACCCAGG 420
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CTCGAAGCTGGACCGAAACGACCTCCTCCACTTAACACGTCGTGCCACGCCTTGGGTCC

421  CTGGGAGGAGGGACAGACCGTCCCACTGGGGAAGACCAAGCAGGCATCCTCACCGCTTC 480
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GACCCCTCCTCCCTGTCTGGCAGGGTGACCCCTTTCTGGTTCGTCCGTAGGAGTGCGGAAG

481  CCTCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTGAGACAGAAGCTGTACCTACCTAC 540
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GGAGTCCACACCTCACTCGTCCTGAAGGTCATGGACTCTGTCTCGACAGTGGATGGATG

541  CCAGCTGCACACCACTTCCGGAGGTGAGAAGCCCACTGGCCTGAAGCCTGTTGTATCCC 600
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GGTGACGTGTGGTGAAGGCCTCCACTCTTCGGGTGACCGGACTTCGGACAACAGTAGGG

601  AGGAGGCTCTTGGCCCTGCCAGCCCTTCCCTATCCTGCCTGCACTCTCCAGTCTCCTCCA 660
   -----+-----+-----+-----+-----+
   TCCTCCGAGAACCAGGACGGTCGGAAGGGATAGGACGGACGTGAGAGGTGAGAGGAGGT

661  GCCTCCTCTCCCTCTGGATGTGAGAGAAGGAGAAGGGTGAACCAAGAAGGTCTATGACT 720
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CGGAGGAGAGGGAGACCTACACTCTCTCCTCTTCCCACTTGGTCTTCCAGGATACTGA

721  TCAGCCCATTTCAGCTTTGTTTTCTGGCTGCCCTATACTCCTCCAAAGGCCGTGCGCTTG 780
   -----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCGGGTAAAGTCGAAACAAAAGACCGGATATGAGGAGGTTTCCGGCAGCGGAAC

781  GTTCTAGGGCTAGTCCCAGCAGTAGAAAAAGAAAAAATAGCTGATCAGAGCTGGAAGAC 840
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CAAGATCCCGATCAGGGTCGTATCTTTTCTTTTATCGACTAGTCTCGACCTTCTG

841  AAGGGAGGGGAAGAAGGCTGGGTGTCTCTCCCTGTTTTCTGGTTATTAAGCAGGGCTTG 900
   -----+-----+-----+-----+-----+
   TTCCCTCCCTTCTTCCGACCCACAGAGAGGGCAAAAAGACCAATAATTCGTCCCGAAC

```

Figur 1-1

2 / 12

1861 CTCTCCCTCCTTCTCCCCACATCTAGCATGAGCCAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG
GAGAGGGAGGAAGAGGGGGTGTAGGATCGTACTCGGTACTAAGGGAATCCCGAGACTCC 1920
E VIII
1921 AAGGCAACACAATGGTACCCAAGAACTGNTACGTAGCCAGCAGGAGCTGAAGCCATTTC
TTCCGTTGTGTACCATGGGTCTTGACNATGCAGTCGGTCGTCCTCGACTTCGGTAAAG 1980
1981 CCTTTGGTGTCCGATTGACTACGTGCTTTACAAGGTCAGGCTCCTCCCTTCAACATGCT
GGAAACCACAGGCGTAACTGATGCACGAAATGTTCCAGTCCGAGGAGGGAAGTTGTACGA 2040
2041 TTCATATGCTGTGTCTCTTTGTCTACTAACCTGTGTAGATCCTTTGCTCAGNTAGTCTAG
AAGTATACGACACAGAGAAACAGATGATTGGACACATCTAGGAAACGAGTCNATCAGATC 2100
2101 TCTTGACCACTGATGGGTGGAAGTGGGGTAGCCGGGAGCTGGTTCTCTGGGAAGAGGC
AGAACCCTGGTGACTACCCACCTTTCACCCCATCGGCCCTCGACCAAGAGACCCCTTCTCCG 2160
2161 CCTCATATATAAGCTTCTCTNTGGCCCTTACTTTTCTAGGCAGTTTCTGGGTTTTACAT
GGAGTATATATTGAAAGAGANACCGGAATGAAAAGGATCCGTCAAAGACCCAAAATGTA 2220
2221 CTCCTGTAAGAGTTTTGAAACCACTACAGGCTTTGACCCTNACAGGGGCACCCCCCTCTC
GAGGACATTCTCAAACTTTGGTGATGTCCGAAACTGGGANITGTCCTCCGTGGGGGGAGAG 2280
E IX
2281 TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTTGTGAGGCACAGCCCCCACAGCAGAACC
AACTAGTACTTCGGGACTACCGATGAGACAAACACTCCGTGTCTGGGGGGTGTCTCTGG 2340
2341 CCAGCTCTACCCACGGTGAGTCACCCCAACCTTTCTTGGCCCTTGCCCGCTTGAAGC
GGTCGAGATGGGTCCCACTCAGTGGGGTGGGAAAGGAACCGGGAACGGGGCGAATTCTG 2400
2401 AGCCCTTCCACTCTTGACTCTCTCTGCCCCACTGCCCTGCTCTGTTGTAGGACCAGCAG
TCGGGAAGGTGAGAACTGAGAGAGGACGGGGTGACGGGACGAGACAACATCCTGGTCGTC 2460
2461 AGAGGTCTCCGTTGATGTGTGTGCTAAAGGAGGCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGCATGG
TCTCCAGCGGCAACTACACACAGATTTCTCCGGACCTGCCTCGACCCAGACCCGTACC 2520
2521 CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCCTGGGGCTGCTTCTCC
GAGTCCGAGCGACCAACCGGTGGAAGCGATCGATACTAACCAGACCCCGACGAAGAGG 2580
E X
2581 TGGCACTGCTGTGTCTCTGGCGGCTGGAGGAGGGCCGGGGAAGCTGCCATACTGCTCT
ACCGTGACGACACAGGACCGCCGACCTCTCCCCGGCCCTTCGACGGTATGACGAGA 2640
2641 GGACCCCCAGTGATGGGCTGGTCTGTGGGAGGTCATTCTACCTCTTCCACGTACAGG
CCTGGGGGTACATCCCGACCACGACCCCGTCCACGTAAGATGGAGAAGGTGCATGTCC 2700
2701 AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCAGGCTGAGCTCCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG
TCCAGTTACCGAATATATCCCGGGTCCGACTCGAGGTCTGACACGATCCTTCCCGTCCCC 2760
2761 AGGCCCAGGATCTGGGCCCAGAGCCTCAGCCAGCCCTACTCCTGGGGCAGCAGGAGGGGG
TCCGGGTCTAGACCCGGGTCTCGGAGTCGGTCCGGATGAGGACCCCGTCTCTCCCCC 2820
ACAGAACTAAAGAACAAATAAGCTTGGCCCAA

Figur 1-2

3 / 12

2821 -----+-----+-----+----- 2852
TGTCTTGATTTCCTGTTATTTCGAACCGGGTT

Figur 1-3

4 / 12

Mouse Neutral Sphingomyelinase (nSMase) gene sequence

```

TNGANNCTGTTAGCTCCAGNCCGGTNGGTCGCCGTNCTAGNCNNATCTNTATAGCTCTTC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ANCTNNGACAATCGAGGTCNGGCCANCCAGCGGCANGATCNGNNTAGANATATCGAGAAG

GTTCGAGCNC AATTNNNTCTCAATAAANGGATNCANCCCTATGACAGAACGTGGACCCC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAACGCTCGNGTTAANNNAGAGTTATTNCTTANGTNGGGATACTGTCTTGACCTGGGG

CGCCCGCCANNCANGNANACCGCGCATGGGCTGAGGTGCNCANGGTGTCTGGGGCG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GCGGGCGGTNGGTNCNCTNTGGCGCGTACCCNGACTCCACGNGTCCACAGACCCCGC

AGGGGTTACCTCAGCGATGGTCTTTGACACCTGAAAGCTGGAGCTTTTGAANAGCCCCAN
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TCCCCAATGGAGTCGCTACCAGAACTGTGGACTTTTCGACCTCGAAAATTNTCGGGGTN

CACCTTCAGCTTCAGGGGCGGCTCNGGCGGCAACCGCACGTGANATGCTGGGGGCTTCGA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GTGGAAGTCGAAGTCCCCGCCGAGNCCGCCGTGGCGTGCACTNTACGACCCCCGAAGT

CTTGGGCGGCGACGGNTGCTGGGTGGCCATGGAANNACAGNACAGAGCCCGGNACACAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GAACCCGGCGGTGCCNACGACCCACCGGTACCTTNNNTGTCTGTCTCGGGCCTGTGTT

ATANTGCGAGTCGCCANGGNAACCGGTGGCTCCTCCCCGAACGCCCNCAAGGGGCGGGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TATNACGCTCAGCGGTNCCNTTGGGCGACCGAGGAGGGGCTTGGGGNGTTCCCGCCCT

CCTGAGTGAGTTCNTGGGCGGGGCTCNCATCAACTTCAAGCCTGTTGCTGGTGAAGCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGACTCACTCAAGNACCCGCCCGGAGNGTAGTTGAAGTTCGGACAACGACCACCTTCGG

GAGCCGGGAACAAGGGAGGAACCTGTAGCCCGGTGCGGATAACCCACCGAAGGACCTA
EI 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTCGGCCCTTGTTCCCTCCTTGGACATCCGGCGCCACGCCTATTGGGTGGCTTCTGGAT

AGAATCTGGAACAGTCCACCCGAGATTCCTTCCAGGACTGCCGGCGGACTCTCGCATTCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCTTAGACCTTGTGAGGTGGGCTCTAAGGAAGGTCTGACGGCGCCCTGAGAGCGTAAGT

GCCCCGGATTTCAGCCGACCTTCTTTCCGGGTGGAATGACGGCCTTTGTCCCAGTAACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CGGGCCCTTAAACGTGCGCTGGAAGAAAGGCCACCTTACTGCCGGAACAGGGTCATTGC

CAGGAGTCNNCCCCACCCCCAACAGCTCGCGTTCTTGGGTGCGGGCAGCGCAGGATAGG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GTCCTCAGNNGGGGTGGGGTTGGTTCGAGCGCAAGGACCCAGCCCCGTGCGGTCTATCC

GCAATAAGCCTGTGCGCGCAATCCGCTCGCGCCCTTGCTCCGAAGCACTCCAGCCATG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGTTATTGGACACGCGCTTAGGCGGAGCGCGGGAAACGAGGCTTCGTGAGGTGCGGTAC

AAGCTCAACTTTTCTCTACGGCTGAGAGTTTCAATCTCAACTGCTGgtaagtaagtgt
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TTCGAGTTGAAAAGAGATGCCGACTCTCAAAAGTTAGAGTTGACGACcattcattcacga

```

Figur 2-1

cccgaggcgtagggctgcagacctcgagaccacacttccaggtccccctctcgcacatgacctagga
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
gggtccgcacccgacgtcgagacctcggtggaaggctcaggggagagcgtgtacggatcct

aggaagcaggtcttcttcagccgagctagacctgtcttcccgaaccaccaaaagttccac
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
tccttcgtccagaagaagtcggctcgatctgggacaggaagggcttggtggtttcaggtg

atcgccctaaagaccagagcttgggtgggttcagcaatcaccaaagtccttatcatccaaa
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
tagcggatttctggtctcgaaccaccaacgctcgttagtggtttcagggatagtaggttt

gctgaggtgatgacagcagtaatcgctcccaaacttgcccatgtctttccttttaaata
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
cgactccactactgtcgtcatttagcagggtttggaccgggtacagaaaggaaaaattact

tttactttttattttatgtacatttggtgttttgccgtgatgtatgtctgtgtgaaggtgc
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
aaatgaaaaataaaatacatgtaaaccacaaaacggacatacatagacacacttccacg

cagattctctggaactggagttacagacagttgtaagctgtcatgtgcttgctggaaatt
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
gtctaagagaccttgacctcaatgtctgtcaacattcgacagtacacgaacgaccttta

gaaactgctgacccatcttcttgcaccttgcgctctccaccccttttagggacatccccct
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
cttgacgactgggtagagaagacgggggacgcaggagggtggggaatccctgtagggga

acctgagcaaacatagggcggaccgcatagaagcgcttgggagactttctgaaacttgaaa
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
tggactcggtttgtatcccgcttggcgtaacttcgcgaaccctctgaaagacttgaaccttt

ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGTAGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAACTAGACCGAGAGGACCTCTCCACTCCAAATCCCGTCCGATCCAACCTCTCCC

CAGCAGGCGGCAGGCGGCGGCAGGAAAATTGTTCTGTCTTGGGATGAAATCCCAAGCAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCGTCCGCCGTCCGCCGCCGTCTTTTGAACAAGACAGAACCCTACTTTAGGGTTCTGT

GTATCCTCACCTTCTCTCCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCCAGTACCTAAGGCAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CATAGGAGTGGAAGAAGGAGGTCCACACCTCACTCGTCTGAAAGGTCATGGATTCCGTT

AGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTCTCTC
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 TCCGATAGCGAGTGGATAGGTCTACGTGTGATGAAGTCTTCCACTTTTCGGACACAAGAG

 AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCTCCAACATTCTTGCTTGCACCTCGATCTTCTTCC
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 TCGGACAAGAGTCTGCTCCTTCGAGAGTTGTAAGAACGAACGTGGGAGCTAGAAGAAGG

 TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTACCCCTCATCTTGCAAGGGCTGTGTCTTAGGCTT
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 AGACCCACACTCTTCTCGTCCGGCAGTGGGAGTAGAACGTTCCCGACGACAGAATCCGAA

 TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 ACAGAGACCCAACTAGAATCGTCACTCGACCCCTCTGGCGCCTCCCTTCTCCCGACCGA

ERSATZBLATT (REGEL 26)

6 / 12

GGGTACTCCCCTCCTTGCTCTTCTGGTTATTAAGCAAGAGTTGGTTTTTCAGCGGGATGAT
1741 -----+-----+-----+-----+-----+ 1800
CCCATGAGGGGAGGAACGAGAAGACCAATAATTCGTTCTCAACCAAAGTCGCCCTACTA

E IV

AGGCAGTGGCCTCTGTGTGTTCTCAAACACCCAATCCAGGAAATCTTCAGCATGTCTA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860
TCCGTCAACGGAGACACACAAGAGGTTTGTGGGTTAGGTCTTTAGAAGGTCGTACAGAT

CAGTCTGAATGGTTACCCCTACATGGTAAGGATCTCTTCCCTATCCTTGCTAACACAGAC
1861 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
GTCAGACTTACCAATGGGGATGTACCATTCTTAGAGAAGGGATAGGAACGATTGTGTCTG

TGGACGCAGCCTTCTTGGGSCCTTGGCAGGAGGGTGTAGTACCCTGAGTTTTTGTCTTC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
ACCTGCGTCGGAAGGACCCCGGAACCGTCTCCACAGTCATGGGACTCAAAACAGAAG

TCTTGCCCTGCAGTTCATCATGAGACTGGTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGGCTGCTGGTG
1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
AGAACGGACGTCAAGGTAGTACCTCTGACCAAGACACCCTTCAGACACCCCGACGACCAC

E V

CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGCTCAATGCCTACGTGACTCATGTGAGTGGGGCTAGCCAG
2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
GAGGCAGATTACCTGACCACGAGTTACGGATGCACTGAGTACACTCACCCCGATCGGTC

GCTTAGGCAGTGGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
CGAATCCGTCAACCCAGTTCGTGGGTTACGATACCACCTCTTCTCTGCGGTGATCAATCA

TCTGCTGCCTGGGGATAAGGCATGGGATCAGAAGCTAGCATTGGGCAAGGTTACCCATT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
AGACGACGGACCCCTATTCCGTACCCTAGTCTTCGATCGTAACCCGTTCCAAGTGGGTAA

CCCTGTCACACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTGAGACAGCCTTCTCTTTGA
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
GGGACAGTGTGAGACGGTACACTGTCTACTGTTGAACTAAGTCTGTCCGAAGAGAACT

TTTCACCTATTCCACTTTAGTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTG
2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
AAAGTGGATAAGGTGAAATCGATGTACGACTCATGTGCGGCTGTCTTCTGTAGATGAAC

E VI

CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAACTGGCCAGTTATCCAGTGTGTGAGCCTGGGCT
2341 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400
GTGTGGCACACCGGTTGAAACCTTGACCGGGTCAAGTAGGTCACACACTCGGACCCGA

TGATGGGGGCTGTGGGGTGGGACGGGTTGAGGGATGNGNAANTATCCTTGAAGAGGG
2401 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460
ACTACCCCGACACCCACCCCTGCCCAACTCCCTACNCTTNAATAGGAACCTTCTCCC

CACATAATAAGGGAAGAAATTCCTTGGCGCTCTTCCCCAACTCAGCCACACATCCA
2461 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520
GTGTATTATTCCCTTCTTAAAGGAGGAACGGCGAGAAGGGGTTGAGTCGGTGTGTAGGT

E VII

AGAATGCAGATGTGGTTCTATTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAAGACCTGGGCT
2521 -----+-----+-----+-----+-----+ 2580
TCTTACGTCTACCAAGATAACACACCTCTGGAGTTATACGTGGGGTTTCTGGACCCGA

Figur 2-3

7 / 12

2581 GCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGGGCTCCATGATGCTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTA
-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
CGACGGACGACTTTCTCACCTGTCCCAGGTACTACGAAAGCAACTCTGACTCCTGAAAT

2641 AGGTGAGAGACTGTTTCCCACTCCACACTTGTTCAGTCTTCCTGTCTCTTAGCAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
TCCACTCTCTGACAAAGGGTGGTTGAGGTGTGAACAAGGTCAGAAGGACAGAGAATCGTA

2701 CCTAGCCACCTGTTTCCCTAGGGCTCTGATGATGGCTGTACCATGGTACCCAAGAACTGC
-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
GGATCGGTGGACAAAGGGATCCCGAGACTACTACCGACATGGTACCATGGGTTCTTGACG

E VIII

2761 TACGTGAGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTCCGTCTGGTATCCGGATTGATTACGTGCTT
-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
ATGCAGTCGGTCGTCTGGACCTGGCAAGGCAGACCATAGGCCTAACTAATGCACGAA

2821 TACAAGGTCAGGCTCTTATTCCCGGTGTGCCTTCTCCAGTATCTTCCTTCTCTGTCACT
-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
ATGTTCCAGTCCGAGAATAAGGECACACGGAAGAGGTATAGAAGGAAGGACAGTGA

2881 AGCCCAAGCTTTAGTTCAGCTACAGTCTTGGGCCACTGATGGCTAAAGAATAGAATCCTG
-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
TCGGGTGCGAAATCAAGTCGATGTGACAACCCGGTACTACCGATTCTTATCTTAGGAC

2941 TCGGCTGGTCTCTGAGGAGAAATTAAGCTTCTCCATGTTCTTGCTCTTCTAGGCAGTCT
-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
AGCCGACCAAGAGACCTCTTAAATTCGAAGAGGTACAAGAAGGATCCGTCAGA

3001 CTGAGTTCACGCTCTGCTGTGAGACTCTGAAAACCACTACAGGCTGTGACCCCTCACAGTG
-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
GACTCAAGGTGCAGACGACACTCTGAGACTTTTGGTGATGTCCGACACTGGGAGTGTAC

E IX

3061 ACAAGCCCTTCTCTGATCAGAGGCCCTCATGGCTACTTGTATGTGAAGCACAGCCCCC
-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
TGTTGCGGAAGAGACTAGTGCTCCGGGAGTACCGATGAAACATACACTTCGTGTGCGGGG

3121 CTCAGGAAGACCCCTGTACTGCCTGTGGTAAGCAGCATTTCCTTGGCCCCCTCTACTTTA
-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
GAGTCCTTCTGGGACATGACGGACACCATTCGTCGTAAAGGAAACGGGGGAGATGAAAT

3181 AGGCAGCCCCGCCTCCATCCTGACCCCTCCCTGCTCTACGTTCTCTTTTTCCAGGCCC
-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
TCCGTGCGGGCGGAGGTAGGACTGGGAGGGGACGAGATGCAAGAGAGAAAAAGGTCCGGG

3241 ACTGGAAAGGTCCGATTTGATCAGCGTGCTAAGGGAGGCCAGGACAGAGCTGGGGCTAGG
-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
TGACCTTCCAGGCTAAACTAGTCGCACGATTCCCTCCGGTCTGTCTCGACCCCGATCC

E X

3301 CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGGCTGTC
-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
GTATCGATTTGAGCGACACCCGACGTAAGAGACCGATACACTAGCAAACCCCGACAG

3361 CCTTCTGGTGTGTGCTGTGTCTCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
GGAAGACCACAACGACACACAGGACCGACGTCCTCTTCTCCGGTCCCTTCCCGGTAGTA

Figur 2-4

8 / 12

CCTCTGCATACCCAGTGTGGGTCTGGTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTCTTCCACAA
3421 -----+-----+-----+-----+ 3480
GGAGACGTATGGGTCAACCCAGACCAGACCATCGTCCACGTGAGATGGAGAAGGTGTT
GCAGGAGGCCAAGGGCTTATGTGGGCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
3481 -----+-----+-----+-----+ 3540
CGTCCTCCGGTTCCCGAATACAGCCCGGGTCCGACTCTACGACGTGCAAGACTGTTCCCT
AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCAGCTAGCCTACTGCTTGACAGCAGGAGGG
3541 -----+-----+-----+-----+ 3600
TTGCCTCTGGGTCTGGCTCCGAGTCTCGGAGTGGATCGGATGACGAACGTGCTCTCC
stop
GGACAGAGCTTAAGAGCTTAACAATAAACTTGCTTGACACACTCTAGTGGCTCTACCTT
3601 -----+-----+-----+-----+ 3660
CCTGTCTCGAATTCTCGAATTGTTATTTGAACGAAGTGTGTGAGATCACCGAGATGGAA
GTTCTTGACAGGCATGATGGGAAGTGAAGGTGAGTGGCTTGTCAGTGTGTGGCTTTA
3661 -----+-----+-----+-----+ 3720
CAAGGAACGTCTCCGTACTACCTTGACTTCCAGTCACCGGAACAGTGACACACCGAAAT
GAGCGTTGGCCTCTCACTTGCTTTTTTGCACTCCCGTCTCCTGCCAGCACAGAGCAT
3721 -----+-----+-----+-----+ 3780
CTCGCAACCGGAGAGTGAACGGAAAAACGTGTGAGGGCAGAGGACGGTCTGTCTCGTA
AAACCCTGTTTCATGGTCATAATCCTTTTATTGTAACAACGAAGCCTCTGACTAAGCAGT
3781 -----+-----+-----+-----+ 3840
TTTGGGACAAGTACCAGTATTAGGAAAATAACATTGTTGCTTCGGAGACTGATTGTCAT
CCAGATGGCGGAGGTACAGCCCTTGTGATGGTGTCTTGCTTACGGGGCAGGGAGGCAGCT
3841 -----+-----+-----+-----+ 3900
GGTCTACCGCCTCCATGTGCGGAACACTACCACAGAACGAATGCCCCGTCCCTCCGTGCA
AACCATCATCTTCTAGCCCTGGGCTCCCATCTATGCAGGCATCTCTCTGAGCCTCCGTTG
3901 -----+-----+-----+-----+ 3960
TTGGTAGTAGAAGATCGGGACCCGAGGGTAGATACGTCCTGAGAGACTCGGAGGCAAG
CTCCTGGAATTGGNTCAGAGCAATCCCGCTTGGTTCACCAACCTCCAACAGCTTCCTTA
3961 -----+-----+-----+-----+ 4020
GAGGACCTTAACCNAGTCTCGTTAGGGCGAACCAAGTGGTGGAGGTTTGTGGAAGGAAT
AGGACCTGGTTTCTCAAAANGGNAAGGTNCGGGCCTCCGGTCTTCAATANGTTTTCCTAA
4021 -----+-----+-----+-----+ 4080
TCCTGGACCAAAGAGTTTTCNCTTCCANGCCCGGAGGCCAGAAGTTATNCAAAAGGATT
AAAGGGANGAATGAAAANCCTTAAGNNCCAACAAGGGGAACCTTGGNCCCAAAGGGGA
4081 -----+-----+-----+-----+ 4140
TTTCCTNCTTACTTTTNGGAATTCNNGGTTGTTCCTTGGGAACNNGGTTTTCCCT
CCTGGGTGGTTTCCNTTGGGGCCAAANTTATCCCAAAGGGTCCAATTGAAGGGTTAAC
4141 -----+-----+-----+-----+ 4200
GGACCCACCAAAGGNAACCCCGGTTTNAATAGGGTTTCCCAGGTTAACTTCCCAATTG
CCCCAAAAANNACCNTTTCCTCCGGAATTTCCAAAGGTTTNNCCCCCGGGCAAAANC
4201 -----+-----+-----+-----+ 4260
GGGGGTTTTNNTGGGNAAGGGGGCTTAAAGGTTTCCAAANGGGGGGGCGTTTTNG

Figur 2-5

9 / 12

```
TCCCTTGGGGNCCNAANCCNTGGCCCGGNCCTTGGCTTTTCCCCCTTTCCCAAGNATTTC
4261 -----+-----+-----+-----+ 4320
AGGGAACCCCNNGGNTTNGGNACCGGGCCNGAACCGAAAAGGGGAAAGGGTTCNTAAAG

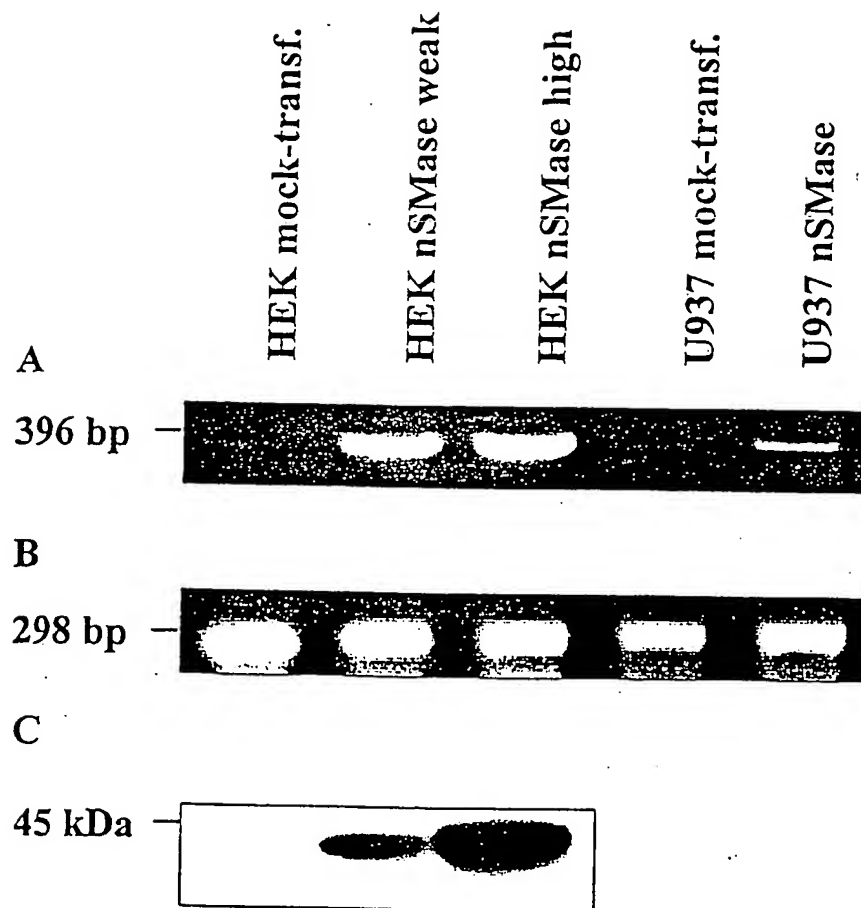
AAANNTTCCCTNGGAAANCCCTTGNTTGGNAAAACCAATNANGAACCAANGCCAANNNT
4321 -----+-----+-----+-----+ 4380
TTTNNAAGGGANCCCTTNGGGGAACNAACCNTTTTGGNTTANTINCTTGGTNCGGTTNNNA

TGCCAANAAACCNNTTGGGCAAAGGGGGNAAATTCANCAANGGGGNAATTGGGGAAACCC
4381 -----+-----+-----+-----+ 4440
ACGGTTNTTTGGNAAACCCGTTTCCCCCNTTTAAGTNGTTNCCCCNTTAACCCCTTTGGG

NTGGGTTTNCCTAAAGGGCCCAANANT
4441 -----+-----+-----+ 4468
NACCCAAANGGGTTTCCCGGGNTTNTNA
```

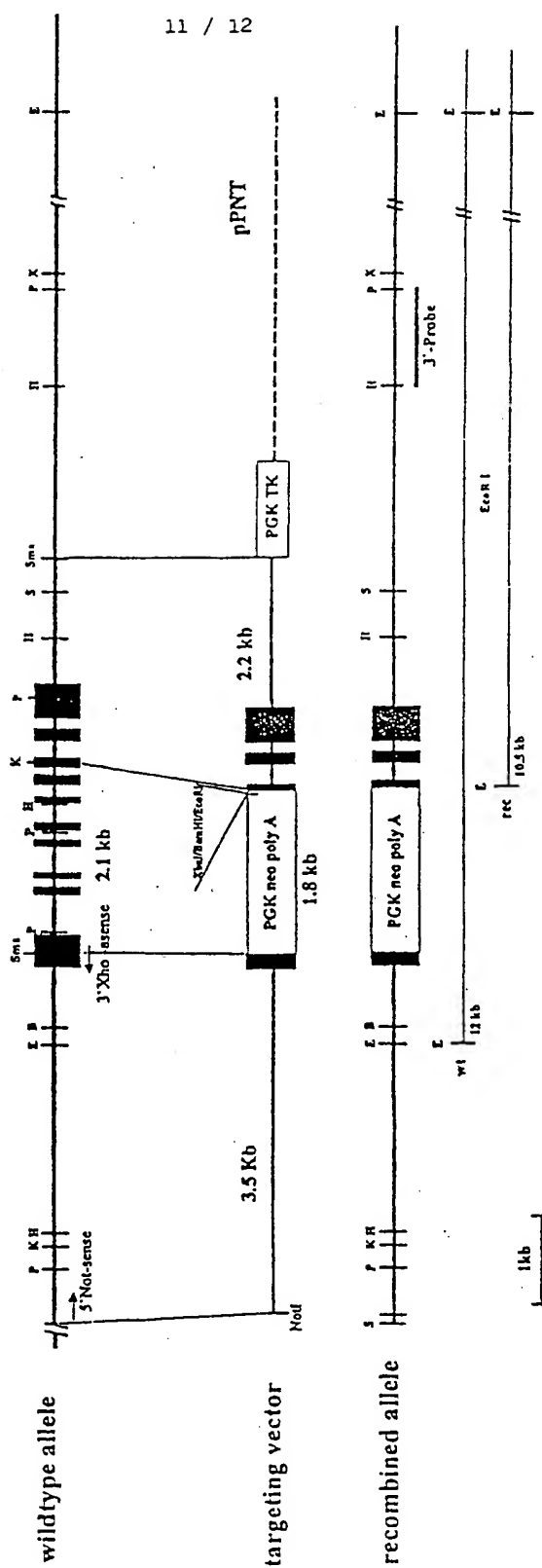
Figur 2-6

10/12



Figur 3

mnSMase "konventional" Knock Out



Figur 4

Konstrukte zur Generierung transgener Mausmutanten

| | | | | |
|-------------------|--------|------|------|-------|
| Ubiquitinpromotor | nSMase | IRES | lacZ | polyA |
| | | | | |

| | | | | | | | |
|-------|------|-----|-------|--------|------|-----|-------|
| polyA | rtTA | CMV | CMV-1 | nSMase | IRES | GFP | polyA |
| | | | | | | | |

Ubiquitinpromotor: Regulationssequenz des Ubiquitin-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

nSMase: neutrale Sphingomyelinase

lacZ: lacZ, Gen kodiert für die β -Galaktosidase

polyA: Erkennungssignal für die Termination der Transkription und Polyadenylierung

CMV: Cytomegalovirus-Promotor des Cytomegalovirus-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

rtTA: reverser Transaktivator, bindet an den Minimalpromotor und steuert dadurch die Transkription. Die Bindungseigenschaften des Transaktivators werden durch Tetrazyklin beeinflusst. Zugabe von Tetrazyklin läßt den Transaktivator an den Minimalpromotor binden und startet die Transkription, Wegnahme von Tetrazyklin verhindert die Bindung des Transaktivators an den Minimalpromotor und verhindert die Transkription.

CMV-1: Minimalpromotor, Bindung des Transaktivators startet die Transkription.

IRES: internal ribosomal entry sequence, virales Initiationssignal für die Translation.

Figur 5

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Memorec Stoffel GmbH
- (B) STRASSE: Stoeckheimer Weg 1
- (C) ORT: Koeln
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 50829

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neutrale Sphingomyelinase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 423 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Ile Phe Asn Leu Asn Cys
 1 5 10 15

Trp Gly Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Arg Arg
 20 25 30

Leu Gly Asp Phe Leu Asn Gln Glu Ser Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu
 35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Lys Leu Ser
 50 55 60

Pro Thr Tyr Pro Ala Ala His His Phe Arg Ser Gly Ile Ile Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Leu Thr Gln His
 85 90 95
 Ile Tyr Thr Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Ile His His Gly Asp Trp
 100 105 110
 Phe Ser Gly Lys Ala Val Gly Leu Leu Val Leu His Leu Ser Gly Met
 115 120 125
 Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Asn Arg Gln
 130 135 140
 Lys Asp Ile Tyr Leu Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala
 145 150 155 160
 Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Lys Ala Asp Val Val Leu Leu Cys
 165 170 175
 Gly Asp Leu Asn Met His Pro Glu Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys
 180 185 190
 Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Tyr Leu Glu Thr Arg Asp Phe Lys
 195 200 205
 Gly Ser Glu Glu Gly Asn Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser
 210 215 220
 Gln Gln Glu Leu Lys Pro Phe Pro Phe Gly Val Arg Ile Asp Tyr Val
 225 230 235 240
 Leu Tyr Lys Ala Val Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Cys Lys Ser Phe Glu
 245 250 255
 Thr Thr Thr Gly Phe Asp Pro His Ser Gly Thr Pro Leu Ser Asp His
 260 265 270
 Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Phe Val Arg His Ser Pro Pro Gln Gln
 275 280 285
 Asn Pro Ser Ser Thr His Gly Pro Ala Glu Arg Ser Pro Leu Met Cys
 290 295 300

Val Leu Lys Glu Ala Trp Thr Glu Leu Gly Leu Gly Met Ala Gln Ala
 305 310 315 320
 Arg Trp Trp Ala Thr Phe Ala Ser Tyr Val Ile Gly Leu Gly Leu Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ala Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Glu
 340 345 350
 Ala Ala Ile Leu Leu Trp Thr Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Trp Ala
 355 360 365
 Gly Ala Phe Tyr Leu Phe His Val Gln Glu Val Asn Gly Leu Tyr Arg
 370 375 380
 Ala Gln Ala Glu Leu Gln His Val Leu Gly Arg Ala Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Asp Leu Gly Pro Glu Pro Gln Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gln Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asp Arg Thr Lys Glu Gln
 420

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 419 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Val Phe Asn Leu Asn Cys
 1 5 10 15
 Trp Asp Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gly Asp Phe Leu Asn Leu Glu Asn Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu
 35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Arg Leu Ser
 50 55 60

Leu Thr Tyr Pro Asp Ala His Tyr Phe Arg Ser Gly Met Ile Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Ile Phe Gln His
 85 90 95

Val Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Phe His His Gly Asp Trp
 100 105 110

Phe Cys Gly Lys Ser Val Gly Leu Leu Val Leu Arg Leu Ser Gly Leu
 115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Ser Arg Gln
 130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Phe Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala
 145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Asn Ala Asp Val Val Leu Leu Cys
 165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Lys Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys
 180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Phe Val Glu Thr Glu Asp Phe Lys
 195 200 205

Gly Ser Asp Asp Gly Cys Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser
 210 215 220

Gln Gln Asp Leu Gly Pro Phe Pro Ser Gly Ile Arg Ile Asp Tyr Val
 225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Glu Phe His Val Cys Cys Glu Thr Leu Lys
 245 250 255

Thr Thr Thr Gly Cys Asp Pro His Ser Asp Lys Pro Phe Ser Asp His
 260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Tyr Val Lys His Ser Pro Pro Gln Glu
 275 280 285

Asp Pro Cys Thr Ala Cys Gly Pro Leu Glu Arg Ser Asp Leu Ile Ser
 290 295 300

Val Leu Arg Glu Ala Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gly Ile Ala Lys Ala
 305 310 315 320

Arg Trp Trp Ala Ala Phe Ser Gly Tyr Val Ile Val Trp Gly Leu Ser
 325 330 335

Leu Leu Val Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Glu Glu Ala Arg Glu
 340 345 350

Val Ala Ile Ile Leu Cys Ile Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Val Ala
 355 360 365

Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Lys Gln Glu Ala Lys Gly Leu Cys Arg
 370 375 380

Ala Gln Ala Glu Met Leu His Val Leu Thr Arg Glu Thr Glu Thr Gln
 385 390 395 400

Asp Arg Gly Ser Glu Pro His Leu Ala Tyr Cys Leu Gln Gln Glu Gly
 405 410 415

Asp Arg Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1662 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCGGCCGCGA CCGCCGGGGA CGAGCTTGGA GGAAAAGGAA CCGGGAGCCG CCCACCCGGG 60
 GCGCTCTCC GGACCCCAG GGTCTAGCG CGCGGCCCTT ACCGAGCCTG GGCGCCCGGA 120
 TTTCGSAGC GGATCGCCTT TCCGGTTGG CGGCCCGCCT GATTGGGAAC AGCCGGCCCG 180

| | |
|---|------|
| TTGCCGGGGG AACGCGGGAG TCGGGCCCGA CCTGAGCCAC GCGGGCTTGG TGCCACCTG | 240 |
| TGCGCGCCGC CTGCGAAGAA GGAACGGTCT AGGGAGAAGG CGCCGCCGGC CGCCCCGTC | 300 |
| CCCACCGCGG CCGTCGCTGG AGAGTTCGAG CCGCCTAGCG CCCCTGGAGC TCCCCAACCA | 360 |
| TGAAGCTCAA CTTCTCCCTG CGACTGCGGA TCTTCAACCT CAACTGCTGG GGCATTCCGT | 420 |
| ACTTGAGCAA GCACCGGGCC GACCGCATGA GCGCCTGGG AGACTTTCTG AACCAGGAGA | 480 |
| GCTTCGACCT GGCTTTGCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG TACCTGAGAC | 540 |
| AGAAGCTGTC ACCTACCTAC CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGCGGAATC ATTGGCAGTG | 600 |
| GCCTCTGTGT CTTCTCCAAA CATCCAATCC AGGAGCTTAC CCAGCACATC TACTCTCA | 660 |
| ATGGCTACCC CTACATGATC CATCATGGTG ACTGGTTCAG TGGGAAGGCT GTGGGGCTGC | 720 |
| TGGTGCTCCA TCTAAGTGGC ATGGTGCTCA ACGCCTATGT GACCCATCTC CATGCCGAAT | 780 |
| ACAATCGACA GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTCG CCAAGCTTGG GAATTGGCCC | 840 |
| AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAAGGCAG ACGTGGTTCT GTTGTTGGA GACCTCAACA | 900 |
| TGCACCCAGA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGGAGTG GACAGGGCTT CATGATGCCT | 960 |
| ATCTTGAAAC TCGGGACTTC AAGGGCTCTG AGGAAGGCAA CACAATGGTA CCCAAGAACT | 1020 |
| GCTACGTCAG CCAGCAGGAG CTGAAGCCAT TTCCCTTTGG TGTCCGCAAT GACTACGTGC | 1080 |
| TTTACAAGGC AGTTTCTGGG TTTTACATCT CCTGTAAGAG TTTTGAAACC ACTACAGGCT | 1140 |
| TTGACCCTCA CAGTGGCACC CCCCTCTCTG ATCATGAAGC CCTGATGGCT ACTCTGTTTG | 1200 |
| TGAGGCACAG CCCCCACAG CAGAACCCCA GCTCTACCCA CGGACCAGCA GAGAGGTCGC | 1260 |
| CGTTGATGTG TGTGCTAAAG GAGGCCTGGA CGGAGCTGGG TCTGGGCATG GCTCAGGCTC | 1320 |
| GCTGGTGGGC CACCTTCGCT AGCTATGTGA TTGGCCTGGG GCTGCTTCTC CTGGCACTGC | 1380 |
| TGTGTGCCT GCGGGCTGGA GGAGGGGCCG GGGAAGCTGC CATACTGCTC TGGACCCCA | 1440 |
| GTGTAGGGCT GGTGCTGTGG GCAGGTGCAT TCTACCTCTT CCACGTACAG GAGGTCAATG | 1500 |

GCTTATATAG GGCCAGGCT GAGCTCCAGC ATGTGCTAGG AAGGGCAAGG GAGGCCAGG 1560
 ATCTGGGCCC AGAGCCTCAG CCAGCCCTAC TCCTGGGGCA GCAGGAGGGG GACAGAACTA 1620
 AAGAACAATA AAGCTTGGCC CTTTAAAAA ·AAAAAAAAAA AA 1662

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1627 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGCTGGTGG AAGCCGAGCC GGGAACAAGG GAGGAACCTG TAGGCCGCGG TGCGAGAACC 60
 CACCGAAGAC CTAAGAATCT GGAACAGTCC ACCCGAGATT CCTTCCAGGA CTGCCGGCGG 120
 CTCGCGCACC AGCCCGGGAT TTGCAGCCGA CCTTCTTTCC GGGTGAAGG ACGGCCTTTG 180
 TCCCAGTAAC GCAGGAGTCG CCCCCACCC CCAACCAGCT CGCGTTCCTG GGTGCGGGCA 240
 GCGCAGGACA GGGCAATAAG CCTGTGCGCG CAATCCGCCT CGCCGCCCTT GCTCCGAAGC 300
 ACTCCAGCCA TGAAGCTCAA CTTTCTCTA CGGCTGAGAG TTTCAATCT CAACTGCTGG 360
 GACATCCCCT ACCTGAGCAA ACATAGGGCG GACCGCATGA AGCGTTGGG AGACTTTCTG 420
 AACTTGAAA ACTTTGATCT GGCTCTCCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG 480
 TACCTAAGGC AAAGGCTATC GCTCACCTAT CCAGATGCAC ACTACTTCAG AAGCGGGATG 540
 ATAGGCAGTG GCCTCTGTGT GTTCTCAAA CACCCAATCC AGGAAATCTT CCAGCATGTC 600
 TACAGTCTGA ATGGTTACCC CTACATGTTT CATCATGGAG ACTGGTTCTG TGGGAAGTCT 660
 GTGGGGCTGC TGGTGCTCCG TCTAAGTGA CTGGTGCTCA ATGCCTACGT GACTCATCTA 720
 CATGCTGAGT ACAGCCGACA GAAGGACATC TACTTTGCAC ACCGTGTGGC CCAAGCTTGG 780

| | |
|---|------|
| GAAGTGGCCC AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAATGCAG ATGTGGTTCT ATTGTGTGGA | 840 |
| GACCTCAATA TGCACCCCAA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAAGAGTG GACAGGGCTC | 900 |
| CATGATGCTT TCGTTGAGAC TGAGGACTTT AAGGGCTCTG ATGATGGCTG TACCATGGTA | 960 |
| CCCAAGAACT GCTACGTCAG CCAGCAGGAC CTGGGACCGT TTCCGTCTGG TATCCGGATT | 1020 |
| GATTACGTGC TTTACAAGGC AGTCTCTGAG TTCCACGTCT GCTGTGAGAC TCTGAAAACC | 1080 |
| ACTACAGGCT GTGACCCTCA CAGTGACAAG CCCTTCTCTG ATCAGCAGGC CCTCATGGCT | 1140 |
| ACTTTGTATG TGAAGCACAG CCCCCCTCAG GAAGACCCCT GTACTGCCTG TGGCCCACTG | 1200 |
| GAAAGGTCCG ATTTGATCAG CGTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA | 1260 |
| GCTAAAGCTC GCTGGTGGGC TGCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT | 1320 |
| CTGGTGTGTC TGTGTGTCCT GGCTGCAGGA GAAGAGGCCA GGAAGTGGC CATCATCCTC | 1380 |
| TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG | 1440 |
| GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG | 1500 |
| GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC | 1560 |
| AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAACTTGC TTGACACACA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA | 1620 |
| AAAAAAA | 1627 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4464 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

| | |
|--|----|
| GACTCGATCC CCGCGAACGC TCGCTCGCGC TCCGAGTCTC TTCCAGGTCTG CCCTTCCTTG | 60 |
|--|----|

CGACCAGCAT TTGTTCTCTA TGCCCCATC CAGCCCTAGG ACAGAACGTG GACCCCCGCC 120
CGCCAGCGCA GGCACACCG CGGCAGGGG CTGAGGTGCG CACGGCGTCT GGGGCGAGGG 180
GTTACCTCAG CGATGGTCTT TGACACCTGA AAGCTGGAGC TTTTGAAGAG CCCCACCACC 240
TTCAGCTTCA GGGGCGGCTC GGGCGGCAAC CGCACGTGAC ATGCTGGGGG CTTCGACTTG 300
GGCCGGCAG GCTGCTGGGT GGCCATGGCA GGGACAGCAG AGAGCCCGGA ACACAAATAG 360
TGCGAGTCGC CAGGGCAACC GCGTGGCTCC TCCCCGAACG CCCGCAAGGG GCGGGACCTG 420
AGTGAGTTCTG TGGGCGGGG CTGCGATCAA CTTCAAGCCT GTTGCTGGTG GAAGCCGAGC 480
CGGGAACAAG GGAGGAACCT GTAGGCCGCG GTGCGGATAA CCCACCGAAG GACCTAAGAA 540
TCTGGAACAG TCCACCCGAG ATTCCTTCCA GGACTGCCGG CGGACTCTCG CATTAGCCCC 600
GGGATTTGCA GCCGACCTTC TTTCCGGGTG GAATGACGGC CTTTGTCCCA GTAACGCAGG 660
AGTAGCCCCC CACCCCCAAC CAGCTCGCGT TCCTGGGTG GGGCAGCGCA GGATAGGGCA 720
ATAAGCCTGT GCGCGCAATC CGCCTCGCCG CCCTTGCTCC GAAGCACTCC AGCCATGAAG 780
CTCAACTTTT CTCTACGGCT GAGAGTTTTC AATCTCAACT GCTGGTAAGT AAGTGCTCCC 840
AGGCGTGGGC TGCAGCCTCG GAGCCACCTT CCAGTCCCCT CTCGCACATG CCTAGGAAGG 900
AAGCAGGTCT TCTTCAGCCG AGCTAGACCC TGTCTTCCC GAACCACCAA AGTCCACATC 960
GCCTAAAGAC CAGAGCTTGG GTGGTTGCAG CAATCACCAA AGTCCCTATC ATCCAAAGCT 1020
GAGGTGATGA CAGCAGTAAT CGTCCCAAAC CTGGCCCATG TCTTTCCTTT TAAATGATTT 1080
ACTTTTATTT TATGTACATT TGGTGTTTTG CCTGTATGTA TGTCTGTGTG AAGGTGCCAG 1140
ATTCTCTGGA ACTGGAGTTA CAGACAGTTG TAAGCTGTCA TGTGCTTGCT GGAAATTGAA 1200
CTGCTGACCC ATCTCTTCTG CCCCCTGCGT CCTCCACCCC TTTTAGGGAC ATCCCCTACC 1260
TGAGCAAACA TAGGGCGGAC CGCATGAAGC GCTTGGGAGA CTTTCTGAAC TTGGAAAAC 1320
TTGATCTGGC TCTCCTGGAG GAGGTGAGGT TGTAGGGCAG GCTAGGTTGG AGGAGGGCAG 1380

CAGGCGGCAG GCGGCGGCAG GAAAACTTGT TCTGTCTTGG GATGAAATCC CAAGCAAGTA 1440
TCCTCACCTT CTTCTCCAG GTGTGGAGTG AGCAGGACTT CCAGTACCTA AGGCAAAGGC 1500
TATCGCTCAC CTATCCAGAT GCACACTACT TCAGAAGGTG AAAAGCCTGT GTTCTCAGCC 1560
TGTTCACAGA CGAGGAAGCT CTCCAACATT CTGCTTGCA CCCTCGATCT TCTTCCTCTG 1620
GGTGTGAGAA GAGCAGGCCG TCACCCTCAT CTGCAAGGG CTGCTGTCTT AGGCTTTGTT 1680
CTGGGGTTGA TCTTAGCAGT AGAGCTGGGA GACCGCGGAG GGAAGAGGG CTGGCTGGGT 1740
ACTCCCTCC TTGCTCTTCT GGTATTAAAG CAAGAGTTGG TTTTCAGCGG GATGATAGGC 1800
AGTGGCCTCT GTGTGTTCTC CAAACACCCA ATCCAGGAAA TCTTCAGCA TGTCTACAGT 1860
CTGAATGGTT ACCCTACAT GGTAAAGATC TCTTCCCTAT CTTGCTAAC ACAGACTGGA 1920
CGCAGCCTTC CTGGGGCCTT GGCAGGAGGG TGTCAGTACC CTGAGTTTTT GTCTTCTCTT 1980
GCCTGCAGTT CCATCATGGA GACTGGTCT GTGGGAAGTC TGTGGGGCTG CTGGTGCTCC 2040
GTCTAAGTGG ACTGGTGCTC AATGCCTACG TGA CTATGT GAGTGGGGCT AGCCAGGCTT 2100
AGGCAGTGGG TCAAGCAGCC CAATGCTATG GTGGAGAAGA GACGCCACTA GTTAGTCTG 2160
CTGCCTGGGG ATAAGGCATG GGATCAGAAG CTAGCATTGG GCAAGGTTCA CCCATTCCCT 2220
GTCACACTCT GCCATGTGAC AGATGACAAG CTTGATTAG ACAGCCTTCT CTTTGATTTC 2280
ACCTATTCCA CTTTAGCTAC ATGCTGAGTA CAGCCGACAG AAGGACATCT ACTTTGCACA 2340
CCGTGTGGCC CAAGCTTGGG AACTGGCCCA GTTCATCCAG TGTGTGAGCC TGGGCTTGAT 2400
GGGGGCTGTG GGGTGGGGAC GGGGTTGAGG GATGNGNAAN TTATCCTTGA AGAGGGCACA 2460
TAATAAGGGA AGAATTTCTT CTTGCGCT CTTCCCCAA CTCAGCCACA CATCCAAGAA 2520
TGCAGATGTG GTTCTATTGT GTGGAGACCT CAATATGCAC CCCAAAGACC TGGGCTGCTG 2580
CCTGCTGAAA GAGTGGACAG GGCTCCATGA TGCTTTCGTT GAGACTGAGG ACTTTAAGGT 2640
GAGAGACTGT TTCCACCAA CTCCACACTT GTCCAGTCT TCCTGTCTCT TAGCATCCTA 2700

| | |
|---|------|
| GCCACCTGTT TCCCTAGGGC TCTGATGATG GCTGTACCAT GGTACCCAAG AACTGCTACG | 2760 |
| TCAGCCAGCA GGACCTGGGA CCGTTTCCGT CTGGTATCCG GATTGATTAC GTGCTTTACA | 2820 |
| AGGTCAGGCT CTTATTCCCG GTGTGCCTTC TCCAGTATCT TCCTTCCTCT GTCACTAGCC | 2880 |
| CACGCTTTAG TTCAGCTACA GTCTTGGGCC ACTGATGGCT AAAGAATAGA ATCCTGTCGG | 2940 |
| CTGGTTCTCT GGGAGAATTT AAGCTTCTCC ATGTTCTTGC TCTTCCTAGG CAGTCTCTGA | 3000 |
| GTTCCACGTC TGCTGTGAGA CTCTGAAAAC CACTACAGGC TGTGACCCTC ACAGTGACAA | 3060 |
| GCCCTTCTCT GATCACGAGG CCCTCATGGC TACTTTGTAT GTGAAGCACA GCCCCCTCA | 3120 |
| GGAAGACCCC TGTACTGCCT GTGGTAAGCA GCATTTCTTT TGCCCCCTCT ACTTTAAGGC | 3180 |
| AGCCCCGCCT CCATCCTGAC CCTCCCCTGC TCTACGTTCT CTCTTTTTC AGGCCCCACTG | 3240 |
| GAAAGGTCCG ATTTGATCAG CGTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA | 3300 |
| GCTAAAGCTC GCTGGTGGGC TGCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTTGGGG GCTGTCCCTT | 3360 |
| CTGGTGTGTC TGTGTGTCCT GGCTGCAGGA GAAGAGGCCA GGGAAGTGGC CATCATCCTC | 3420 |
| TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG | 3480 |
| GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG | 3540 |
| GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGACGCA GGAGGGGGAC | 3600 |
| AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAACTTGC TTGACACACT CTAGTGGCTC TACCTTGTTT | 3660 |
| CTTGACAGAG CATGATGGGA ACTGAAGGTC AGTGGCCTTG TCACTGTGTG GCTTTAGAGC | 3720 |
| GTTGGCCTCT CACTTGCCTT TTTTGACAC TCCCGTCTCC TGCCAGCACA GAGCATAAAC | 3780 |
| CCTGTTGATG GTCATAATCC TTTTATTGTA AACACGAAG CCTCTGACTA AGCAGTCCAG | 3840 |
| ATGGCGGAGG TACAGCCCTT GTGATGGTGT CTTGCTTACG GGGCAGGGAG GCAGCTAACC | 3900 |
| ATCATCTTCT AGCCCTGGGC TCCCATCTAT GCAGGCATCT CTCTGAGCCT CCGTTCCTCC | 3960 |
| TGGAATTGGN TCAGAGCAAT CCCGCTTGGT TCACCAACCT CCAAACAGCT TCCTTAAGGA | 4020 |

| | |
|---|------|
| CCTGGTTTCT CAAAANGGNA AGGTNCGGGC CTCCGGTCTT CAATANGTTT TCCTAAAAAG | 4080 |
| GGANGAATGA AAANCCTTAA GNNCCAACAA GGGGAACCCCT TGGNCCCAA AGGGGACCTG | 4140 |
| GGTGGTTTCC CNTTGGGGCC AAANTTATCC CAAAGGGGTC CAATTGAAGG GTTAACCCCC | 4200 |
| CAAAAANNAC CCNTTCCCC CGGAATTTCC AAAGGTTTNC CCCCCCGGC AAAANCTCCC | 4260 |
| TTGGGGNNCC NAANCCNTGG CCCGGNCTTG GCTTTTCCCC CTTTCCCAAG NATTTCAAAN | 4320 |
| NTCCCTNGG AAANCCCCCTT GNTTGGNAAA ACCNAATNAN GAACCANGCC AANNNTTGCC | 4380 |
| AANAAACCNT TTGGGCAAAG GGGGNAAATT CANCAANGGG GNAATTGGGG AAACCCNTGG | 4440 |
| GTTTNCCTAA AGGGCCCNAA NANT | 4464 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2852 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

| | |
|---|-----|
| ACCGCGCCG TCGCTGGAGA GTTCGAGCCG CCTAGCGCCC CTGGAGCTCC CCAACCATGA | 60 |
| AGCCCAACTT CTCCCTGCGA CTGCGGATCT TCAACCTCAA CTGCTGGTGA GTGCGTCTGC | 120 |
| GGAGTGCGGT CTGGGGGCCA CCTTCCGTTC GCACCCATGC AGCCTTCCTC CCCCTATCCC | 180 |
| GCCCCACGAT CTCAGGTGT AGGGAAAACC CGAACCTCCA AAGTCCACAT CTGGCCCCAG | 240 |
| CGCCGGTGGT CCCAGCAGTC GCCTCCCCTG CCCCCTCTT CCCTTCCTTA GGGGCATTCC | 300 |
| GTACTTGAGC AAGCACCGGG CCGACCGCAT GAGGCGCCTG GGAGACTTTC TGAACCAGGA | 360 |
| GAGCTTCGAC CTGGCTTTGC TGGAGGAGGT GAGATTGTGC AGCACGGTGC GGAACCCAGG | 420 |
| CTGGGAGGAG GGACAGACCG TCCCACTGGG GAAAGACCAA GCAGGCATCC TCACCGCTTC | 480 |

CCTCAGGTGT GGAGTGAGCA GGA CTTCAG TACCTGAGAC AGAAGCTGTC ACCTACCTAC 540

CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGGTGAGAA GCCCACTGGC CTGAAGCCTG TTGTCATCCC 600

AGGAGGCTCT TGGCCCTGCC AGCCCTTCCC TATCCTGCCT GCACTCTCCA GTCTCCTCCA 660

GCCTCCTCTC CCTCTGGATG TGAGAGAAGG AGAAGGGTGA ACCAAGAAGG TCCTATGACT 720

TCAGCCCATT TCAGCTTTGT TTTCTGGCTG CCCTATACTC CTCAAAGGC CGTCGCCTTG 780

GTTCTAGGGC TAGTCCCAGC AGTAGAAAAA GAAAAAATA GCTGATCAGA GCTGGAAGAC 840

AAGGGAGGGG AAGAAGGCTG GGTGTCTCTC CCTGTTTTTC TGGTTATTAA GCAGGGCTTG 900

GCTTTCAGCG GAATCATTGG CAGTGGCCTC TGTGTCTTCT CCAAACATCC AATCCAGGAG 960

CTTACCCAGC ACATCTACAC TCTCAATGGC TACCCCTACA TGGTAAGGCA GACCTTTGAC 1020

CTCTTCCACC TCCCTTCCCC ACCTCCAGTA ATACAAGGTA GAGGAGGCAG CCCTCTGAGA 1080

GCTGCAGGGG ATGGGCAGAA AGATGGTGGC GGTGCCCTGA GTTCTATCT CCTCTGCCT 1140

GCAGATCCAT CATGGTGA CTGTTCACTG GAAGGCTGTG GGGCTGCTGG TGCTCCATCT 1200

AAGTGGCATG GTGCTCAACG CCTATGTGAC CCATGTGAGT GAAGCTGGCA GTGCCTAGGG 1260

CTGGGACATG CAGCCCAGTC CTGGGACAGA GAGATGGTAC TTCTCTAGCT CTCATACCTG 1320

GGGATGAGGT GTGGGGGCAA GATCTTATAA GGAAGCAATG GGCAAGGCTT ATCCATTGTA 1380

TACCAAACAC CATGCCAAGT GACAGACACA GGCTTGATTG AGACATACCC CTGGGACCCT 1440

CAGTCTTATC TGCTGTGATC TCATCCATCT TGCTCAGCTC CATGCCGAAT ACAATCGACA 1500

GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTGGC CCAAGCTTGG GAATTGGCCC AGTTCATCCA 1560

GTGTGTGAGC CTGGGCTTGA AATGGGAAGT GGGATGGGAC CCAGGGGCTG AGGGTGAACA 1620

AGGCCCCAGT CATGGGGAAG AGCTGGTGAT GGAAGAACTC CCGCCTCACC AACCTGGTTC 1680

CCCCAGCCAC ACATCCAAGA AGGCAGACGT GGTCTGTGTTG TGTGGAGACC TCAACATGCA 1740

CCCAGAAGAC TGGGCTGCTG CCTGCTGAAG GAGTGGACAG GGCTTCATGA TGCCTATCTT 1800

GAAACTCGGG ACTTCAAGGT GAGGACTTGC CTGTTACTTC CCCACCTATA TCCCCAGCTT 1860
CTCTCCCTCC TTCTCCCCCA CATCCTAGCA TGAGCCAATG ATTCCCTTAG GGCTCTGAGG 1920
AAGGCAACAC AATGGTACCC AAGAACTGNT ACGTCAGCCA GCAGGAGCTG AAGCCATTTC 1980
CCTTTGGTGT CCGCATTGAC TACGTGCTTT ACAAGGTCAG GCTCCTCCCT TCAACATGCT 2040
TTCATATGCT GTGTCTCTTT GTCTACTAAC CTGTGTAGAT CCTTTGCTCA GNTAGTCTAG 2100
TCTTGACCA CTGATGGGTG GAAAGTGGGG TAGCCGGGAG CTGGTTCTCT GGGAAGAGGC 2160
CCTCATATAT AAGCTTCTCT NTGGCCCTTA CTTTTCCTAG GCAGTTTCTG GGTTTTACAT 2220
CTCCTGTAAG AGTTTTGAAA CCACTACAGG CTTTGACCCT NACAGGGGCA CCCCCCTCTC 2280
TTGATCATGA AGCCCTGATG GCTACTCTGT TTGTGAGGCA CAGCCCCCA CAGCAGAACC 2340
CCAGCTCTAC CCACGGTGAG TCACCCCCAC CCTTTCCTTG GCCCTTGCCC CGCTTGAAGC 2400
AGCCCTTCCA CTCTTGA CTCCTGCCC CACTGCCCTG CTCTGTTGTA GGACCAGCAG 2460
AGAGGTCGCC GTTGATGTGT GTGCTAAAGG AGGCCTGGAC GGAGCTGGGT CTGGGCATGG 2520
CTCAGGCTCG CTGGTGGGCC ACCTTCGCTA GCTATGTGAT TGGCCTGGGG CTGCTTCTCC 2580
TGGCACTGCT GTGTGTCCTG GCGGCTGGAG GAGGGGCCGG GGAAGCTGCC ATACTGCTCT 2640
GGACCCCCAG TGTAGGGCTG GTGCTGTGGG CAGGTGCATT CTACCTCTC CACGTACAGG 2700
AGGTCAATGG CTTATATAGG GCCCAGGCTG AGCTCCAGCA TGTGCTAGGA AGGGCAAGGG 2760
AGGCCAGGA TCTGGGCCCC GAGCCTCAGC CAGCCCTACT CCTGGGGCAG CAGGAGGGGG 2820
ACAGAACTAA AGAACAATAA AGCTTGGCCC AA 2852

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/05127

| | | |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/55 C12N9/16 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/50 A61K38/43 A01K67/027 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document | 1-3,5-7, 9,21,24 |
| A | --- WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30 --- | 4,8, 10-20, 22,23 |
| P,X | --- WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998 see abstract see figures 1,2 see claims 1-30 --- | 1-3,5-7, 9,14-19, 21,24 |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">11 December 1998</div> | | Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">29/12/1998</div> |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer <div style="text-align: center;">Galli, I</div> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/05127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | <p>KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract</p> | 3 |
| A | <p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract</p> | 14-17 |
| A | <p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1</p> | 1-24 |
| P,X | <p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document</p> | 1-11, 20-24 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05127

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

information on patent family members

PCT/EP 98/05127

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Jonaies Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

| | | |
|---|---|--|
| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES | | |
| IPK 6 | C12N15/55 A61K38/43 | C12N9/16 A01K67/027 |
| C12N5/10 | C07K16/40 | G01N33/50 |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK | | |
| B. RECHERCHIERTE GEBIETE | | |
| Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) | | |
| IPK 6 C12N C07K A61K A01K G01N | | |
| Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie ¹ | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 21, 25. Juli 1989, Seiten 12554-12561, XP002087487 siehe das ganze Dokument | 1-3,5-7, 9,21,24 |
| A | --- | 4,8, 10-20, 22,23 |
| P,X | WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2. Juli 1998 siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen 1,2 siehe Ansprüche 1-30 --- | 1-3,5-7, 9,14-19, 21,24 |
| | -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "C" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | | Absenddatum des internationalen Recherchenberichts |
| 11. Dezember 1998 | | 29/12/1998 |
| Name und Postanschnitt der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter Galli, I |

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|---------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Beitr. Anspruch Nr. |
| A | <p>KOSTELLOW A ET AL.: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS"</p> <p>FASEB JOURNAL, Bd. 10, Nr. 6, 30. April 1996, Seite A1253 XP000644454 siehe Zusammenfassung ---</p> | 3 |
| A | <p>CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity."</p> <p>J. BIOL. CHEM., Bd. 272, Nr. 11, 14. März 1997, XP002087488 siehe Zusammenfassung ---</p> | 14-17 |
| A | <p>DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18. Mai 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 Vergleiche mit Aminosäuren 247-394 in Seq. ID 1 ---</p> | 1-24 |
| P,X | <p>TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?"</p> <p>PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 95, Nr. 7, 31. März 1998, Seiten 3638-3643, XP002087489 siehe das ganze Dokument -----</p> | 1-11, 20-24 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/ 05127

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 16 und 17
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle, internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9828445 A | 02-07-1998 | AU 5809398 A | 17-07-1998 |

